

RAPD를 이용한 한국산 줄장지뱀(Reptilia: Squamata)의 종내 다양성에 관한 연구

장 민 호 · 송 재 영 · 정 규 회*

경기대학교 생물학과

Intraspecific Diversity of Korean *Takydromus wolteri* (Reptilia: Squamata) Based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis

Min-Ho Chang, Jae-Young Song and Kyu-Hoi Chung*

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

Abstract - The lacertid lizard *Takydromus wolteri* widely distributed in South Korea, but intraspecific diversity of this species was not almost studied. *T. wolteri* represented by 8 specimens collected from 5 localities were analyzed by the Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method with 28 random decamer primers and the phenogram constructed by using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) method based on RAPD data. The populations of *T. wolteri* using in this paper were collected from Gyeonggi-do, Chungcheongbuk-do, Jeju-do, Jeollanam-do and Gyeongsangnam-do in South Korea. Among 68 different bands detected in RAPD analysis, 59 bands (87%) showed polymorphism. The phenogram showed that the populations of *T. wolteri* were grouped into two. These results suggest that *T. wolteri* were supported intraspecific diversity.

Key words : intraspecific diversity, *Takydromus wolteri*, RAPD

서 론

장지뱀 과 (Reptilia: Squamata)의 장지뱀 속 (*Takydromus*)은 유라시아 및 아프리카 지역에 거의 대부분이 존재하고, 20속 150여종이 분포하는 것으로 알려져 있으며, 동아시아 지역에 약 16종이 분포하고 있다 (Arnold 1997; Lin *et al.* 2002; Ota *et al.* 2002).

한반도에 분포하는 장지뱀 과 (Family Lacertidae)는 2

속 6종, 즉 표범장지뱀 속 (Genus *Eremias*)의 표범장지뱀 (*Eremias argus*) 및 장지뱀 속 (Genus *Takydromus*)의 장지뱀 (*Takydromus auroralis*), 줄장지뱀 (*T. wolteri*), 아무르장지뱀 (*T. amurensis*), 올디장지뱀 (*T. tachydromoides oldi*) 그리고 관악장지뱀 (*T. kwangakuensis*)이 서식하고 있다. 이 중 줄장지뱀은 중국 동부까지, 아무르장지뱀은 연해주부터 대마도까지 분포하고 있고, 올디장지뱀, 관악장지뱀과 장지뱀은 한국 고유종이다. 그러나 이들에 대한 분류학적 문제점이 지적되고 있으며, 종분화에 대한 유전적 해석도 충분하게 되어 있지 않다 (Doi 1920; Doi 1929; Shannon 1956; Walley 1958a, b; 강과 윤 1975;

* Corresponding author: Kyu-Hoi Chung, Tel : 031-249-9641,
Fax : 031-251-4721, e-mail : gusidai@empal.com

Arnold 1997; Hikida 2002).

한국산 파충류의 연구사는 Strauch에 의해 3종을, Stejneger는 다시 11종을 추가하여 14종을 보고 한바 있으며, Shannon 등에 의해 추가적인 보고가 있었다 (Stejneger 1907; Shannon 1956). 한국산 뱀류에 대한 연구에서는 Paik *et al.* (1979), Paik *et al.* (1990), Paik *et al.* (1992) 등에 의해서 형태적, 생화학적, 유전적 연구가 이루어 졌고, Paik and Yang (1986), Paik and Yang (1989) 등에 의해 뱀류의 종내 다양성에 대한 연구가 이루어 졌다. 한국산 장지뱀류에 대한 연구는 Doi (1920, 1929), Walley (1958a, b, 1962), 강과 윤 (1975), 백과 심(1999) 그리고 심 (2001) 등에 의하여 이루어졌고, 또한 환과 송(1998)과 Shim and Lee (2003) 등에 의하여 장지뱀류의 분포에 대해 연구가 수행되었다. 하지만, 대부분의 선임 연구들이 줄장지뱀에 비해 넓은 서식지와 큰 폭의 형태적 다양성을 갖고 있는 아무르장지뱀 위주로 수행되어 왔고 (Walley 1958a, 1962), 한국산 줄장지뱀에 대한 종내 다양성 연구는 거의 전무한 상태이다.

PCR의 한 변형형태인 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)는 primer를 이용하여 DNA fingerprints를 나타내며, 적은 양의 DNA (0.5~50.0 ng)로 수행이 가능하고, 방사성 동위원소를 사용하지 않는 장점이 있다. 현재 RAPD는 분류군, 군집내의 분류와 진화에 대한 분석 등에 쓰이고 있다 (Griffin and Griffin 1994; Ryabinina *et al.* 1998).

따라서 본 연구는 종 및 개체군 사이의 유전적 차이 연구 시 이용되는 RAPD 방법을 이용하여 한반도 내의 줄장지뱀의 지역 집단간 차이 및 유연관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 줄장지뱀은 총 8개체 (5개 집단)를 사용하였으며, 채집 후 모든 재료는 경기대학교 생태학 연구실 (Kyonggi University, Ecological Lab.; KUEL) 내에서 95% ethanol에 보관하였다 (Table 1).

2. DNA 추출

채집한 개체에서 DNA를 얻기 위하여 꼬리의 조직을 적출한 후, -70°C 로 1시간동안 냉동처리한 후 E-Tube에 옮긴 후, 500 μL extraction buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate]를 넣고 homogenizer를 이용하여 조직을 분

Table 1. Materials and collection data of *Takydromus* which were used in this study

Species	Locality	Abbreviation
	Sunghae-ri, Anjung-eup, Pyongtaek-si, Gyeonggi-do	GG1, GG2
	Hwayang-ri, Chungchun-myeon, Goesan-gun Chungcheongbuk-do	CB1, CB2
<i>T. wolteri</i>	Bongsung-ri, Aewol-eup, Bukjeju-si, Jeju-do	JJ1
	Nanjeon-ri, Samho-myeon, Yeongam-gun, Jeollanam-do	JN
	Sunheul-ri, Jocheon-eup, Jeju-si, Jeju-do	JJ2
	Naengjung-ri, Jiphyeon-myeon, Jinju-si, Gyeongsangnam-do	GN

쇄하였으며, proteinase K와 phenol을 이용하여 DNA를 분리하였다 (Sambrook and Rusell 2001).

3. RAPD 분석

줄장지뱀의 RAPD분석을 위하여 Polymerase Chain Reaction (PCR)법을 이용하였으며, 각각의 조성은 template DNA (50 ng μL^{-1}) 1 μL , dNTP (2.5 mM) 1 μL , Taq polymerase (5 Unit μL^{-1}) 1 μL , PCR buffer 2.5 μL (GeneClone Co., Korea), U.B.C primer (100 pmole) 1 μL 로 하였으며, 증류수를 17.5 μL 첨가하여 총 volume을 25 μL 로 하였다. PCR은 총 45 cycle을 시행하였으며, 각 cycle은 denaturation 94°C , 1분; annealing 38°C , 2분; polymerization 72°C , 1분으로 하고, 추가적으로 initial denaturation을 94°C 에서 3분, final extention을 72°C 에서 5분동안 실시하였다.

4. 유연관계의 분석

전기영동을 통하여 전개된 DNA fragment의 각 band를 하나의 형질로 취급하여, band가 나타난 것은 '1', 나타나지 않은 것은 '0'으로 표기하였다. 이를 통해 구해진 전체 OTU에 대한 자료행렬을 작성하였으며, Nei's (1972) genetic distance로서 비유사도 지수 행렬을 산출하였다. Phenogram은 PAUP* 4.0b8 (Swofford 2002)의 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)으로 분석하였다.

결과 및 고찰

본 실험에서는 총 28개의 U.B.C random decamer pr-

Table 2. The list of random decamer primer used of the RAPD

U.B.C primer	Sequence (5' → 3')	G+C content (%)
4	cctgggctta	60
125	gcggttgagg	70
127	atctggcagc	60
129	gcggtatagt	50
133	ggaaacctct	50
135	aagatgcgag	50
141	atcctgttcg	50
142	atctgttcgg	50
150	gaaggctctg	70
174	aacgggcagc	70
175	ggtgctgat	50
181	atgacgacgg	60
190	agaatccgcc	60
191	cgatggcttt	60
193	tgctggcttt	50
194	aggacgtgcc	70
198	gcaggactgc	70

imer (-4, -121, -125, -127, -129, -133, -134, -135, -140, -141, -142, -143, -144, -150, -161, -172, -174, -175, -181, -183, -186, -187, -190, -191 -193, -194, -197, -198)를 사용하였으며, 그 중 유의성이 있는 17개의 primer (-4, -125, -127, -129, -133, -135, -141, -142, -150, -174, -175, -181, -190, -191 -193, -194, -198)를 이용하여 분석하였다(Table 2). 그 결과 총 68개의 band를 관찰 할 수 있었고 이 중 약 87%인 59개의 polymorphism이 확인되었다(Table 3). Band의 유무에 따라 작성된 기초 자료 행렬을 토대로 PAUP* 4.0b8 (Swofford 2002)을 이용하여 Nei's (1972) genetic distance를 이용한 상사도 지수 행렬을 작성하였고, UPGMA phenogram을 작성하였다.

사용된 primer의 G+C content는 50% (-129, -133, -135, -141, -142, -175, -193)인 것이 7개, 60% (-4, -127, -181, -190, -191)인 것이 5개, 70% (-125, -150, -174, -194, -198)인 것이 5개였다.

RAPD 분석에서 줄장지뱀 개체간의 상사도 지수는 0.020에서 0.139 (평균 0.075)으로 확인되었고, GG1과 GG2는 0.045, JJ1과 JJ2는 0.036, CB1과 CB2는 0.041으로 나타나 집단간의 차이보다 집단 내에서 차이가 적은 것을 알 수 있었다(Table 4).

UPGMA 분석에 따른 유집분석에서 크게 두 개의 Group, 즉 GG1, GG2, CB1, CB2, JN 이 Group 1을 이루었으며, JJ1, JJ2, GN이 Group 2를 이루었다(Fig. 1). 이런 지역 집단간의 유전적인 차이는 지리적 격리와 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 추정 된다. Group 1에서, 충청북도

Table 3. Distribution of RAPD depend on primer

U.B.C primer	Number of total bands	Number of polymorphic bands
4	4	4 (100)*
125	9	7 (78)
127	3	3 (100)
129	2	2 (100)
133	4	3 (75)
135	5	5 (100)
141	6	6 (100)
142	1	1 (100)
150	7	4 (57)
174	2	2 (100)
175	3	2 (67)
181	4	4 (100)
190	4	4 (100)
191	4	4 (100)
193	5	3 (60)
194	3	3 (100)
198	2	2 (100)
Total	68	59 (87)

* Percentage of polymorphic bands from total bands.

Table 4. Genetic dissimilarity matrix calculated by Nei's (1972) genetic distance based on RAPD for *T. wolteri*

	GG1	GG2	CB1	JJ1	JN	JJ2	CB2	GN
CG1	-							
CG2	0.045	-						
CB1	0.068	0.058	-					
JJ1	0.099	0.079	0.106	-				
JN	0.096	0.079	0.043	0.074	-			
JJ2	0.107	0.087	0.096	0.036	0.057	-		
CB2	0.072	0.070	0.041	0.072	0.020	0.055	-	
GN	0.139	0.094	0.131	0.085	0.066	0.070	0.064	-

* Find the abbreviation in Table 1.

는 거리상으로 경기도 지역과 가깝지만, 충청북도 집단은 경기도 집단에 비해 전라남도 집단과 유전적으로 매우 유사하게 나타났다. 이러한 유전적 차이를 보이는 것은 차령산맥 등에 의한 지리적 격리로 추정된다. 경기도와 충청북도 사이에는 차령산맥이 존재해서 두 지역에 분포하는 줄장지뱀간의 유전적 공유를 방해하지만, 충청북도와 전라남도 집단 사이에는 논산평야와 호남평야 등 넓은 평지가 형성되어 있어서, 이들 지역에서 줄장지뱀이 보다 쉽게 이동할 수 있을 것으로 추정되며, 그로인한 유전적 공유를 이룬 것으로 추정된다. 줄장지뱀과 같이 저지대에 분포하는 참개구리류 3종 (*R. nigromaculata*, *R. porosa brevipoda* and *R. porosa porosa*)의 경우는 산맥, 화산 등의 지리적 영향에 의해 종이 분화된 대표적 예이다(Matsui 1996).

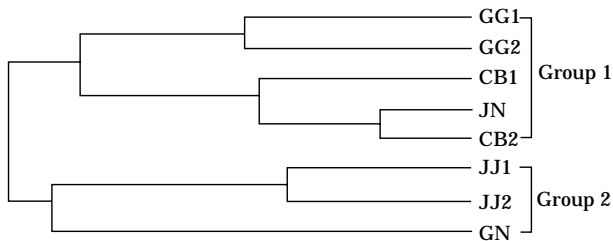


Fig. 1. A phenogram by UPGMA method of the population of *T. wolteri*.

Group 2에서, 제주도는 약 200만년 전에 생성된 것으로 알려져 있으며 (Kazuo 1990), 제주도가 한반도로부터 분리된 것은 약 1만년 전부터 2만년 전에 지금의 모습이 되었다고 보고 있다 (Park 1988). 지금의 모습이 생성되기 전까지 간빙기와 빙기를 여러 차례 거치면서 생겼던 해수면의 변화는 제주도와 내륙의 지리적 격리가 생기게 하였다. 제주도와 내륙이 연결되었을 때는 줄장지뱀이 자유롭게 지금의 제주도 지역까지 이동하였으며, 이후 간빙기 때 해수면이 높아지면서 제주도는 지리적으로 격리가 되어 제주도 집단만의 독립성을 갖게 되었을 것이고, 다시 빙기가 오면서 지리적 격리가 없어져 다시 내륙과의 이동이 가능해 졌을 것으로 추정된다. 이와 같은 몇 번의 반복으로 제주도와 한반도의 남부 지역 사이의 유전적 공유가 이루어졌을 것으로 판단된다. 이와 비슷한 분포 양상은 제주도롱뇽 (*Hynobius quelpaertensis*)이 제주도 지역과 남부 일부 지역에만 서식하고 있는 것과 일치한다 (양 등 2001; Kim et al. 2003).

또한, 제주도 집단과 경상남도 집단으로 나뉘는데, 이는 일부 기간동안의 해수면에 의한 지리적 격리로 추정된다.

특히, 경상도 지역의 유전적 특이성은 Nei's (1972) genetic distance와 phenogram을 통해서 다른 지역 집단들 간의 차이보다 큰 것으로 나타났다. 이는 선행된 담수 어류의 연구에서도 지리적 격리로 인한 경상도 지역의 독립성이 나타나고 있다. 이러한 예로, 담수 어류 중 경상도 영천의 피라미 (*Zacco platypus*), 가시고기 (*Pungitius sinensis*), 밀어 (*Rhinogobius brunneus*) 그리고 영덕과 경주의 왕종개 (*Cobitis longicarpus*) 4배체 경우 특정 유전 인자가 타 지역에서는 볼 수 없는 독특한 대립인자로 구성된 경우들이 보고 된 바 있으며 (Yang and Min 1990; Kim et al. 1991; Min and Young 1991; Kim and Yang 1996), 양서류의 경우에서도 어류와 같은 특징들이 잘 나타나고 있다.

양서류의 경우 경남분지에 의해서 움개구리 (*Rana rugosa*)의 지역적 특이성 (양 등 2001)이 나타나며, 도롱뇽류 (*Hynobiidae*)의 경우에는 부산광역시 기장군 장안

읍 고리 지역에서 완전히 종분화된 고리도롱뇽 (*H. yangi*)이 보고 되었다 (Kim et al. 2003).

본 연구에서, RAPD 분석에 의해 지리적 격리를 통한 지역 집단간의 종내 변이가 발생한 것을 알 수 있었다. 또한, 경상도 집단에 대한 형태적, 생태적 그리고 다른 유전적 분석 등을 통한 추가적인 연구가 필요할 것이라고 판단된다.

적 요

한반도 전지역에 줄장지뱀이 서식하고 있지만, 이 종에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다. 한반도의 5지역 (경기도, 충청북도, 제주도, 전라남도, 경상남도)의 한국산 줄장지뱀에 대해 RAPD method를 통한 종내 유전적 차이를 비교 하였다. 총 28개의 primer를 사용하였고, 그 중 유의성이 있는 17개의 primer에 대한 결과를 Nei's (1972) genetic distance를 통해 유전적 거리와 UPGMA 방법을 통한 phenogram을 구하였다.

그 결과 총 68개의 밴드를 확인 했고, 이 중 87%인 59개의 polymorphism이 확인 되었다. 이를 통한 phenogram에서는 GG1, GG2, CB1, CB2, JN이 Group 1을 이루었으며, JJ1, JJ2, GN이 Group 2를 이루었다. 줄장지뱀의 경우 지리적 격리를 통한 집단간의 종내 변이가 발생한 것으로 추정된다. 특히, 경상남도 지방의 유전적 독립성이 두드러지는데, 이는 다른 분류군인 어류나 양서류에서도 나타나고 있다. 따라서 이들 집단에 대한 형태적, 생태적 그리고 다른 유전적 분석 등을 통한 추가적인 연구가 필요할 것이라고 판단된다.

사 사

본 연구 수행에 있어 많은 자문과 도움을 주신 경기대학교 생물학과 이상섭 교수님, 유병선 교수님, 윤병수 교수님에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 강영선, 윤일병. 1975. 한국동식물도감제 17권 동물편 (양서류·파충류). 문교부. 191pp.
 백남극, 심재한. 1999. 뱀. 지성사. 197pp.
 심재한. 2001. 꿈꾸는 푸른 생명 거북과 뱀. 다른 세상. 280pp.
 양서영, 김종범, 민미숙, 서재화, 강영진. 2001. 한국의 양서류.

- 아카데미서적. 187pp.
- 한상훈, 송재영. 1998. 고흥(팔영산)일대의 포유류 및 양서, 파충류. pp.111-117. 고흥(8-18)의 자연환경. 환경부.
- Arnold EN. 1997. Interrelationships and evolution of the east Asian grass lizards, *Takydromus* (Squamata: Lacertidae). Zool. J. Linn. Soc. 119:267-296.
- Doi H. 1920. *Takydromus kwangakuensis* sp. nov. from Korea. Chosen Iho. 1920:70-75.
- Doi H. 1929. A new species of *Takydromus* from Corea. J. Chosen Nat. His. Soc. 9:17-19.
- Griffin HG and AG Griffin. 1994. PCR technology : current innovations. CRC press. Florida.
- Hikida T. 2002. Natural history of the reptiles. University of Tokyo press. Tokyo.
- Kazuo O. 1990. The history of straits around the Japanese islands in the Late-quaternary. Quaternary Res. 29: 193-208.
- Kim JB, JM Kim and SY Yang. 1991. Geographic variation of lamina circularis in *Cobitis longicorpus* (Pisces: Cobitidae). Korea J. Zool. 34:103-109.
- Kim JB, MS Min and M Matsui. 2003. A new species of lentic breeding Korea salamander of the genus *Hynobius* (Amphibia, Urodela). Zool. Sci. 20:1163-1169.
- Kim JM and SY Yang. 1996. Systematic studies on the freshwater goby, *Rhinogobius* species (Perciformes, Gobiidae). II. Geographic distribution and taxonomic status of three color types in the *Rhinogobius brunneus* complex from South Korea. Korea Syst. Zool. 12:331-347.
- Lin SM, CA Chen and KY Lue. 2002. Molecular phylogeny and biogeography of the grass lizards Genus *Takydromus* (Reptilia: Lacertidae) of east asia. Mol. Phylogenet. Evol. 22:276-288.
- Matsui M. 1996. Natural history of the amphibian. University of Tokyo press. Tokyo.
- Min MS and SY Yang. 1991. Systematic study on the genus *Zacco* (Pisces, Cyprinidae). I. Genetic variation. Korea J. Zool. 34:557-570.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. Amer. Natur. 106:283-292.
- Ota H. 2002. Phylogenetic relationships, taxonomy, character evolution and biogeography of the lacertid lizards of the genus *Takydromus* (Reptilia: Squamata): a molecular perspective. Biol. J. Linn. Soc. 76:493-509.
- Paik NK, YJ Kim and SY Yang. 1979. Biochemical variation and systematic status of the genus *Agkistrodon* (Crotalidae) in Korea. Korean J. Zool. 22:153-163.
- Paik NK and SY Yang. 1986. Taxonomic study on two subspecies of European grass snake (*Rhabdophis tigrina*) in Korea. Korean J. syst. Zool. 2:79-92.
- Paik NK and SY Yang. 1989. Geographic variation and interspecific hybridization between two species of the genus *Agkistrodon* (Crotalinae) in Korea. Korean J. syst. Zool. 5:77-88.
- Paik NK, HY Lee and EK Jung. 1990. Heteroplasmy in mitochondrial DNA of Chinese viper, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. Koran J. Genet. 12:331-336.
- Paik NK, HY Lee, EK Jung and IS Kim. 1992. Genetic differentiation of mitochondrial DNA in the genera, *Enhydryis* and *Elaphe*. Koran J. Genet. 14:89-98.
- Park YA. 1988. Continental shelf sedimentation. pp.406-426. In Geology of Korea (Lee D.S. eds) Kyohak-sa. Seoul.
- Ryabinina NL, VV Grechko and IS Darevskii. 1998. Polymorphism of RAPD Markers in lizard Populations of Family Lacertidae. Russian J. Genet. 34:1415-1420.
- Sambrook J and DW Rusell. 2001. Molecular cloning. Cold spring harbor laboratory press. New York.
- Shannon FA. 1956. The reptiles and amphibians of Korea. Herpetologica 12:22-49.
- Shim JH and SC Lee. 2003. Herpetofauna biodiversity and ecological research at the Mt. Cheondeung, Chungju-si. Korean J. Nat. Con. I:81-93.
- Stejneger L. 1907. Herpetology of Japan and adjacent territory. U.S. Nat. Mus. 58:1-577.
- Swofford DL. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). V.4.0b8. Smithsonian institution. Massachusetts.
- Walley HD. 1958a. The status of *Takydromus kwangakuensis*. Copeia 1958:338-339.
- Walley HD. 1958b. A new lacertid lizard from Korea. Herpetologica 14:203-205.
- Walley HD. 1962. The identity of Korea lizard, *Takydromus auroralis* Doi. Herpetologica 18:215-216.
- Yang SY and MS Min. 1990. Genetic variation and systematics of the sticklebacks (Pisces, Gasterosteidae) in Korea. Korean J. Zool. 32:232-241.

Manuscript Received: March 10, 2004

Revision Accepted: May 23, 2004

Responsible Editorial Member: Myung Chan Gye
(Hanyang Univ.)